

Südamelihase rakkude struktuuri olulisus raku hingamise regulatsioonis

Tuuli Käämbre^{1,2}, Peeter Sikk¹, Tiia Anmann¹, Toomas Tiivel¹, Natalja Timohhina^{1,2}, Anu Nutt¹, Kersti Tepp¹, Valdur Saks¹ – ¹Keemilise ja Bioloogilise Füüsika Instituut, ²Tallinna Ülikool

Võttesõnad: mitokondriaalne hingamine, isoleeritud kardiomyotsüüt, kontraheeruvad HL-1 rakud, mittekontraheeruvad HL-1 rakud

Viimastel aastatel on järjest selgemaks saanud seos raku energiaainevahetuse ja südamehaiguste vahel, mistõttu on oluline uurida seda mõjutavaid tegureid. Töös uuriti südamelihase rakkude mitokondriaalse hingamise regulatsiooni väga erineva rakustruktuuriga preparaatides: 1) permeabiliseeritud kardiomyotsüütides, kus mitokondrid on regulaarselt organiseeritud; 2) südamelihase fenotüübiga sarnastes kontraheeruvates HL-1 (B HL-1) rakkudes ja 3) HL-1 mittekontraheeruvates (NB HL-1) rakkudes. Nende preparaatide vahel esines suur erinevus mitokondriaalse hingamise regulatsioonis. Selline tulemus näitab raku struktuuri ja funktsiooni vaheliste seoste tähtsust südamelihase rakkudes ning võimaldab paremini mõista protsesse nii terves kui ka patoloogilises südamelihases.

Intaktsetes südamelihase rakkudes paiknevad mitokondrid väga regulaarselt sarkomeeri A-liinil ning on funktsionaalselt sisetatud rakkusisestest ATPd tarbivate süs-

teemidega, moodustades hästi organiseeritud rakkusiseseid energiaühikuid (1, 2). See metaboolne süsteem võimaldab kirjeldada mitokondriaalse hingamisega seotud rakkusisest infrastruktuuri ja energiavoogusid rakukompartimentide vahel ning on südame süsteemse bioenergeetika põhiliseks uurimisobjektiks. Tõestamaks järjest olulisemaks muutuvat seost rakkude struktuuri ja funktsiooni vahel on mitokondriaalse hingamise regulatsiooni uuritud võrdlevalt nii intaktsetes kardiomyotsüütides kui ka HL-1 rakkudes. HL-1 rakuliini on saanud transgeensete hiirte südamekodade kasvajakudest dr W. C. Claycomb (3). Kasutati kahte tüüpi HL-1 rakke: 1) kontraheeruvaid B HL-1 rakke, mis sisaldavad märgatavalt organiseeritud sarkomeere ning mida võib pidada struktuuri organiseeritusest vahepealseteks võrreldes embrüonaalsete ja täiskasvanud müotsüütidega ning 2) mittekontraheeruvaid NB HL-1 rakke, kus mitokondrid on filamentsed, liikuva ja kaootilise paigutusega.

MATERJALID JA MEETODID

1. KARDIOMÜOTSÜÜTIDE ISOLEERIMINE

Kardiomyotsüüdid isoleeriti roti südame perfusioonil kollagenaasiga (Blendzyme 1, Roche), kohandades selleks varem välja töötatud meetodikat (4).

2. RAKUKULTUURID

HL-1 rakuliinid saadi dr W. C. Claycombilt (Louisiana State University Health Science Center, New Orleans, LA, USA). Rakke kultiveeriti varem ilmunud eeskirja kohaselt (5).

3. HINGAMISE REGULATSIOONI KINEETIKA

Permeabiliseeritud rakkude hapnikutarbimine registreeriti oksügraafil (Strathkelvin Instruments). Kardiomiotsüüdid ja HL-1 rakud permeabiliseeriti oksügraafi küvetis, kasutades saponiini (20–50 µg/ml). Reaktsioonikeskkonnana kasutati lahust Mitomed (6), mille koostis on järgmine: 110 mM sahharoosi; 60 mM K-laktobionaati; 0,5 mM EGTA; 3 mM MgCl₂; 0,5 mM ditiotreitooli; 20 mM tauriini; 3 mM KH₂PO₄; 20 mM K-HEPESi; pH 7,1; substraadina 5 mM glutamaati, 2 mM malaati, 2 mg/ml rasvhapevaba härja seerumi albumiini (BSA).

4. RAKKUDE TRÜPSIINIGA TÖÖTLEMINE

Rakke töödeldi trüpsiiniga kontsentratsiooni vahemikus 0,025–1,0 µM 5 minutit 4 °C juures. Trüpsiin inhibeeriti, lisades 2 mM STId (*Soya Trypsin Inhibitor*) ja 2 mg/ml BSAd.

5. KONFOKAALMIKROSKOPIA

Mitokondrid visualiseeriti konfokaalmikroskoopia abil, lähtudes varem publitseeritud meetoditest (5). Kasutati fluorestseeruvaid värve MitoTracker® Deep Red (NB HL-1 rakkudes) ja MitoTracker® Red (isoleeritud kardiomiotsüütides).

6. KASUTATUD REAGENDID

Kõik katses kasutatud reagensid on pärit kahelt firmalt: Roche (Meylan, Prantsusmaa) ja Fluka (Buchs, Šveits).

TULEMUSED

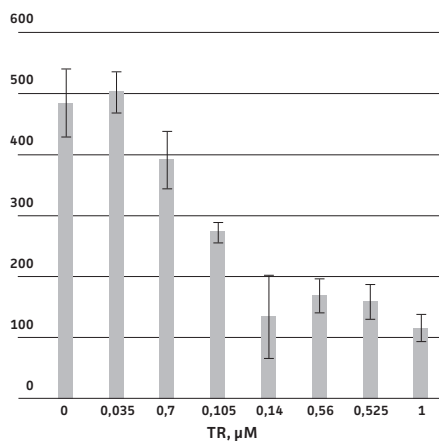
Kardiomiotsüütide ja HL-1 rakkude hapnikutarbimise regulatsioonis ilmnasid suured erinevused: näiline Michaelise konstant (Km) eksogeense ADP suhtes oli suurusjärgu võrra väiksem permeabiliseeritud mittekontraheeruvatel NB HL-1 rakkudel, milles puuduvad sarkomeerid, võrreldes primaarsete kardiomiotsüütidega ning vahepealne normaalselt kultiveeritud B HL-1 rakkudel (vt tabel 1). Selline mitokondriaalse hingamise suur tundlikkus eksogeense ADP suhtes on sarnane selle parameetriga isoleeritud mitokondrite jaoks (ligikaudu 20 µM).

See näitab, et erinevalt isoleeritud kardiomiotsüütidest puuduvad NB HL-1 rakkudes ADP rakusise difusiooni takistused. B HL-1 rakkudes on osa sarkomeersetest struktuuridest veel säilinud, kuid nende tundlikkus ADP suhtes on siiski palju suurem kui normaalsetel kardiomiotsüütidel.

Tabel 1. Raku hingamise näilise Michaelise konstandi sõltuvus südameraku preparaadi tüübist

Preparaat	Raku hingamise näiline Michaelise konstant Km (ADP), µM
Isoleeritud permeabiliseeritud kardiomiotsüüdid	486 ± 51
B HL-1 rakud	110 ± 18
NB HL-1 rakud	25 ± 4

Täiskasvanud kardiomiotsüütide puhul saavutati mitokondrite paiknemise täielik desorganiseerumine (7) pärast lühiajalist trüpsiiniga töötlemist ning sellega kaasnes Km (ADP) drastiline vähenemine (vt jn 1).



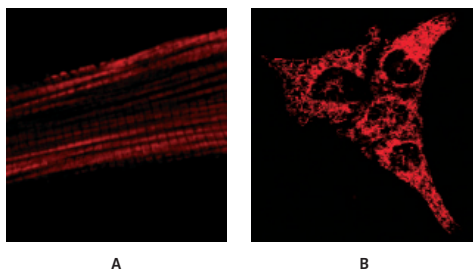
Joonis 1. Isoleeritud kardiomiotsüütide mitokondriaalse hingamise näilise Km-i sõltuvus trüpsiini kontsentratsioonist.

ARUTELU

Suur Km väärtus eksogeense ADP suhtes intaktsetes kardiomiotsüütides on kvantitatiivselt kirjeldatav lokaalsete difusioonitakistustega ADP jaoks mitokondri välismembraani tasemel organiseeritud intratsellulaarsetes energeetilistes üksustes.

NB HL-1 rakkude suur afinsus ADP suhtes osutab lokaalsete difusioonitakistuste puudumisele nendes rakkudes.

Tulemused näitavad, et normaalsetes täiskasvanud kardiomiotsüütides on lokaalsed difusioonitakistused ADP jaoks ning metaboolne tagasisidestatud regulatsioon transfosforüülimisreaktsioonide võrgustiku kaudu on tagatud raku keerulise struktuurse organiseeritusega. Väga korrapärase struktuuriga rakkudes, nagu südamelihase rakud (vt jn 2), on mitokondrite positsioonid fikseeritud tõenäoliselt seni identifitseerimata tsütoskeleti valkude poolt. Millised need on, ei ole veel selge. Sellele viitab ka normaalse- ja struktureerimata rakkude näiliste Michaelise konstantide suur erinevus.



Joonis 2. Kardiomiotsüüdi (A) konfokaalmikroskoopia kujutisel paiknevad mitokondrid väga regulaarselt erinevalt NB HL-1 rakkudest (B), kus sarkomeersed struktuurid on kadunud.

Kuigi ei ole veel selge, millised tsütoskeleti elemendid vastutavad mitokondrite positsioneerimise ja difusioonitakistuste eest südamelihase rakus, on rakuhingamise suure näilise Michaelise konstandi füsioloogiline roll selge: kerge keheline treening suurendab seda nii inimese kui ka katseloomade südame- ja skeetilihas-tes (8–10). See parameeter on selge diagnostilise väärtusega (9, 10) ning seega on edaspidi perspektiivne kardiomiotsüütide ja HL-1 rakkude võrdlev analüüs proteomikameetoditega, et identifitseerida raku komponente, mis vastutavad energiaülekande süsteemi organiseerituse eest.

Selge sõltuvus raku struktuuri ja funktsiooni vahel võimaldab uuel tasemel mõista seoseid häirete vahel südameraku energieetikas südamehaiguste tekkimisel ning parandada seniseid ravistrateegiaid.

TÄNUAVALDUS

Tööd on rahastanud Haridus- ja Teadusministeerium (sihtfinantseerimine nr SF0182549Bs03) ning Eesti Teadusfond (grant nr 6142). Täname TTÜ küberneetikainstituudi vanemteadurit Marko Vendelini kardiomiotsüütide konfokaalmikroskoopia kujutiste eest ning meie tehnikut Maire Peitlit hea tehnilise assisteerimise eest.

KIRJANDUS

- Seppet E, Kaambre T, Sikk P, et al. Functional complexes of mitochondria with MgATPases of myofibrils and sarcoplasmic reticulum in muscle cells. *Biochim Biophys Acta* 2001;1504:379–95.
- Saks VA, Kaambre T, Sikk P, et al. Intracellular energetic units in red muscle cells. *Biochem J* 2001;356:643–57.
- Claycomb WC, Lanson NA Jr, Stallworth BS, et al. HL-1 cells: a cardiac muscle cell line that contracts and retains phenotypic characteristics of the adult cardiomyocyte. In *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:2979–84.
- Saks VA, Belikova YO, Kuznetsov AV. In vivo regulation of mitochondrial respiration in cardiomyocytes: specific restrictions for intracellular diffusion of ADP. *Biochim Biophys Acta* 1991;1074:302–11.
- Pelloux S, Robillard J, Ferrera R, et al. Non-beating HL-1 cells for confocal microscopy: application to mitochondrial functions during cardiac preconditioning. *Prog Biophys Mol Biol* 2006;90:270–98.
- Gnaiger AV, Kuznetsov S, Schneeberger R, et al. Mitochondria in the cold. In: Heldmaier G, Klingenspor M, eds. *Life in the cold*. Heidelberg: Springer; 2000. p.431–42.
- Anmann T, Guzun R, Beraud N, et al. Different kinetics of the regulation of respiration in permeabilized cardiomyocytes and HL-1 cells. Importance of cell structure/organization for respiration regulation *Biochim Biophys Acta* 2006;1757:1597–606.
- Zoll H, Sanchez B, N'Guessan F, et al. Physical activity changes the regulation of mitochondrial respiration in human skeletal muscle. *J Physiol* 2002;543:191–200.
- Zoll J, N'Guessan B, Ribera F, et al. Preserved response of mitochondrial function to short-term endurance training in skeletal muscle of heart transplant recipients. *J Am Coll Cardiol* 2003;42:126–32.
- Guerrero K, Wuyam B, Mezin P, et al. Functional coupling of adenine nucleotide translocase and mitochondrial creatine kinase is enhanced after exercise training in lung transplant skeletal muscle. *Am J Physiol* 2005;289:R1144–R1154.

SUMMARY

**Importance of cellular organization
in regulation of respiration in cardiac
muscle cells**

The **AIM OF THIS WORK** was to compare the cellular regulation of mitochondrial respiration in permeabilized cardiomyocytes, where intermyofibrillar mitochondria are arranged in a highly ordered crystal-like pattern, and in the HL-1 cells from mouse heart.

METHODS. Two types of HL-1 cells were used: 1) HL-1 beating cells (B HL-1 cells) which contain quite organized sarcomeres and represent somewhat of a hybrid between an embryonic myocyte and an adult myocyte and 2) HL-1 non-beating cells (NB HL-1 cells) without sarcomeres.

RESULTS. Striking differences were observed in the kinetics of respiration regulation by exogenous ADP between these cells: apparent K_m for exogenous

ADP was by an order of magnitude lower in permeabilized non-beating NB HL-1 cells without sarcomeres ($25 \pm 4 \mu\text{M}$) than in permeabilized primary cardiomyocytes ($486 \pm 51 \mu\text{M}$), and intermediate in normally cultured HL-1 cells ($110 \pm 18 \mu\text{M}$). High affinity for exogenous ADP in NB HL-1 cells demonstrates the absence of significant diffusion restrictions in these cells in contrast to adult cardiomyocytes.

CONCLUSION. The results of this study show that in normal adult cardiomyocytes intracellular local restrictions of diffusion of adenine nucleotides and metabolic feedback regulation of respiration via phosphotransfer networks are related to the complex structural organization of these cells.

tuuli@kbfi.ee